

Katarzyna Szczypa<sup>1</sup>, Joanna Wilemska<sup>1</sup>, Waleria Hryniewicz<sup>1</sup>, Izabela Sitkiewicz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków, Warszawa

Wpłynęło w listopadzie 2011 r.

1. Wstęp. 2. Charakterystyka zakażeń powodowanych przez *S. pyogenes*. 3. Czynniki wirulencji *S. pyogenes*. 3.1. Adhezyny. 3.2. Czynniki sprzyjające rozprzestrzenianiu się infekcji w organizmie gospodarza. 3.3. Toksyny. 4. Regulacja ekspresji czynników wirulencji. 5. Podsumowanie

#### Pathogenicity mechanisms of *Streptococcus pyogenes*

1. Introduction. 2. Infections caused by *S. pyogenes*. 3. Virulence factors of *S. pyogenes*. 3.1. Adhesins. 3.2. Factors of infections in host organism. 3.3. Toxins. 4. Regulation of virulence factors expression. 5. Summary

**Abstract:** The group A *Streptococcus* (*Streptococcus pyogenes*, GAS) is responsible for over 600 million infections and over half million deaths a year. GAS is a major human pathogen which causes diseases ranging from mild superficial infections of the throat or skin, up to severe systemic and invasive diseases such as necrotizing fasciitis and streptococcal toxic shock syndrome. Nowadays, post-infection sequelae such as glomerulonephritis and rheumatic fever are also alarming medical problems worldwide.

Molecular analyses of streptococcal virulence carried by multiple centers worldwide, suggest the presence of a complex mechanism that coordinates pathogenesis. It involves a broad range of unique protein virulence factors, as M protein, superantigens, proteases and DNases, affecting tissues and the host's immune system.

Detailed analyses of individual virulence factors as well as regulatory systems that coordinate expression of virulence factors are the first steps on the way to develop innovative strategies for diagnostics and treatment. This review aims to highlight the epidemiology of *S. pyogenes* and summarize the current state of knowledge about the mechanisms of its virulence.

**Słowa kluczowe:** *Streptococcus pyogenes*, czynniki wirulencji, regulacja ekspresji czynników wirulencji

**Key words:** *Streptococcus pyogenes*, virulence factors, regulation of virulence factor expression

## 1. Wstęp

*Streptococcus pyogenes* (paciorkowiec grupy A, GAS) jest wiodącym czynnikiem zakażeń u ludzi a zakażenia nim, także o charakterze epidemii, opisywano już w ubiegłych tysiącleciach. Przełomowe odkrycia z zakresu biologii i chorobotwórczości tego drobnoustroju, jakich dokonano w przeszłości, stanowią istotną podstawę wiedzy na temat tego patogenu.

Obecnie pomimo ogromnego postępu nauk medycznych w zakresie diagnostyki, leczenia i epidemiologii zakażeń, na całym świecie nadal notuje się wysoką (ponad 700 milionów rocznie) zapadalność na różnego rodzaju infekcje wywołane przez GAS. Sytuacja ta dotyczy w szczególności krajów rozwijających się. Według Światowej Organizacji Zdrowia szacunkowa liczba zgonów w wyniku poważnych infekcji GAS wynosi ponad pół miliona przypadków rocznie i umieszcawia *S. pyogenes*, pośród najczęstszych patogenów człowieka [9]. Co ważniejsze, od końca lat 80-tych XX w., z wielu krajów zaczęły napływać doniesienia o ciężkich uogólnionych zakażeniach *S. pyogenes* skutkujących wysoką śmiertelnością. Liczba tego typu zakażeń ciągle wzrasta i może stanowić poważny problem diagnostyczno-terapeutyczny [18].

## 2. Charakterystyka zakażeń powodowanych przez *S. pyogenes*

*S. pyogenes* może wywoływać zakażenia o różnym stopniu ciężkości. W literaturze istnieje wiele systemów klasyfikacji chorób wywoływanych przez ten drobnoustrój [18, 19, 84]. Zakażenia można podzielić na: (i) łagodne i ciężkie, (ii) inwazyjne i nieinwazyjne, (iii) ropne i odległe nieropne powikłania, oraz (iv) powierzchwne i głębokie. W tabeli I przedstawiono zakażenia wywoływane przez GAS, uwzględniając podział na trzy grupy: zakażenia nieinwazyjne, inwazyjne oraz nieropne następstwa o podłożu immunologicznym.

Do najczęstszych zakażeń wywoływanych przez *S. pyogenes* należą ostre zapalenie gardła i migdałków podniebiennych (angina paciorkowcowa) oraz płonica. Szacuje się, że rocznie na świecie występuje ponad 600 milionów przypadków paciorkowcowego zapalenia gardła, w tym ponad 550 milionów dotyczy krajów rozwijających się [9]. Infekcja gardła o etiologii GAS występuje przede wszystkim u dzieci w wieku 5–15 lat, natomiast dorośli chorują rzadziej [74, 83]. Należy jednak podkreślić, że zakażenia GAS nie ograniczają się do wieku dziecięcego ani do zapaleń gardła. Znacznie poważniejszymi w bezpośrednich skutkach są zakażenia skóry

\* Autor korespondencyjny: Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków; Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa; isitkiewicz@cls.edu.pl

Typy infekcji wywoływane przez *S. pyogenes*

Rodzaj choroby	Przykłady zakażeń
nieinwazyjna	zapalenie gardła lub migdałków podniebiennych ( <i>pharyngitis, tonsillitis</i> ) płonica ( <i>scarlatina</i> ) liszajec zakaźny ( <i>impetigo contagiosa</i> ) zapalenie zatok ( <i>sinusitis</i> ) zapalenie ucha środkowego ( <i>otitis media</i> ) zapalenie pochwy ( <i>vaginitis</i> )
inwazyjna	przebieg lekki i średnio-ciężki: zakażenie tkanki podskórnej ( <i>cellulitis</i> ), bakteriemia, róża ( <i>erysipelas</i> ) zapalenie mięśni ( <i>myositis</i> ) zapalenie płuc ( <i>pneumonia</i> ), zakażenie połogowe ( <i>infectio puerperalis</i> ) zapalenie stawów ( <i>arthritis</i> ), przebieg ciężki: paciorkowcowy zespół wstrząsu toksycznego, martwicze zapalenie powięzi ( <i>fascitis necrotisans</i> ) zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych ( <i>meningitis cerebro-spinalis</i> )
nieropne następstwa o podłożu immunologicznym	gorączka reumatyczna ( <i>morbus rheumaticus</i> ), kłębuszkowe zapalenie nerek ( <i>glomerulonephritis</i> )

i tkanki podskórnej. Wiadomo bowiem, iż w dużej liczbie przypadków inwazyjna postać zakażenia GAS wywodzi się z tych schorzeń, które ze względu na lokalizację bardzo łatwo mogą ulec rozprzestrzenieniu [65]. Dane szacunkowe na temat występowania paciorkowcowego zapalenia skóry dotyczą głównie krajów rozwijających się, gdzie rocznie może występować około 118 milionów takich przypadków [9].

Liszajec zakaźny jest miejscowym ropnym zapaleniem skóry, występującym najczęściej u dzieci w wieku od 2 do 5 lat. Sposób przenoszenia liszajca nie został dobrze poznany, wiadomo jednak, że choroba jest wysoce zakaźna, rozprzestrzenia się szczególnie łatwo w dużych zbiorowiskach dzieci, poprzez bezpośredni kontakt z osobą zainfekowaną oraz przedmioty wspólnego użytku. Choroba występuje częściej w klimacie gorącym i wilgotnym, gdzie może mieć związek z ukąszeniami owadów, jak również w zimniejszych klimatach w sezonie letnim. Rozprzestrzenianiu zakażenia sprzyja też niski poziom higieny [7].

*Cellulitis* to zakażenie o różnorodnej lokalizacji, obejmujące głębsze warstwy skóry oraz tkankę podskórną. Do zakażenia dochodzi wskutek uszkodzenia naskórka lub inną drogą poprzez naczynia krwionośne, bądź limfatyczne. Zmiany najczęściej lokalizują się w obrębie kończyn dolnych. Pierwszymi objawami są rumień i obrzęk, ale nie tak wyraźnie odgraniczony jak w różę [7].

Róża (*erysipelas*) jest typowym dla GAS ostrym, wyraźnie odgraniczonym od otaczających tkanek, stanem zapalnym skóry, obejmującym również skórne naczynia limfatyczne. Zaliczana jest często do zakażeń o charakterze inwazyjnym, o przebiegu zazwyczaj nie-

ciężkim. Charakterystycznym objawem tej choroby jest połyskujący rumień, który może być zlokalizowany na twarzy, tułowiu lub kończynach dolnych. W tym ostatnim przypadku predysponowane są osoby chorujące na zaburzenia krążenia żylnego, u których wystąpiło np. owrzodzenie podudzi. Zachorowanie na różę może mieć również związek z przeprowadzonymi wcześniej zabiegami chirurgicznymi (róża przyrana) [71]. Choć róża występująca na twarzy może w ciągu 4–10 dni ulec samowyleczeniu, to nieleczona może doprowadzić do poważnych powikłań. W przypadku kończyn i tułowia, kiedy chorobą są objęte większe powierzchnie ciała, może dojść do zakażeń uogólnionych lub nawrotów choroby (róża nawrotowa) prowadzących do trwałych zmian w naczyniach chłonnych [50].

Istotnymi postaciami zakażeń wywołanych przez *S. pyogenes* są piorunujące infekcje o charakterze inwazyjnym prowadzące do zgonu nawet w ciągu kilku lub kilkunastu godzin od wystąpienia pierwszych, często mało charakterystycznych objawów choroby [9].

Inwazyjna choroba wywołwana przez paciorkowce grupy A jest definiowana, jako ciężkie zakażenie z objawami, któremu towarzyszy izolacja *S. pyogenes* z fizjologicznie jałowych tkanek i narządów (krew, płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn otrzewnowy, opłucnowy, osierdziowy, stawowy, biopiat tkankowy). Kliniczne prezentacje inwazyjnej choroby GAS można podzielić na trzy grupy [42]:

- Paciorkowcowy zespół wstrząsu toksycznego (*streptococcal toxic shock syndrome, STSS*) – bardzo szybko postępująca choroba powodująca spadki ciśnienia tętniczego/wstrząs, wysoka gorączkę, rozlaną wysypkę oraz niewydolność wielonarządową;

- Martwicze zapalenie powięzi (*necrotising fasciitis*, NF) – gwałtownie postępujące zakażenie w obrębie tkanki podskórnej i powięzi przebiegające z wtórną martwicą skóry;
- Zakażenia, w których nie stwierdzono objawów STSS lub NF, ale charakteryzujące się izolacją *S. pyogenes* z fizjologicznie jałowych tkanek i narządów. W grupie tej znajduje się bakteriemia o nieznanym źródle pochodzenia oraz infekcje takie jak zapalenie płuc, opon-mózgowo rdzeniowych, otrzewnej, szpiku i kości, septyczne zapalenie stawów oraz zakażenia okołoporodowe (gorączka połogowa).

STSS i NF są niezwykle ciężkimi postaciami zakażenia GAS. Szacuje się, że około 20% pacjentów z NF i 60–80% z STSS umiera. Śmiertelność wśród pacjentów z innymi typami inwazyjnych zakażeń GAS wynosi 10–15% [30]. W badaniach przeprowadzonych w Polsce, które dotyczyły inwazyjnych zakażeń GAS zaobserwowano wysoki odsetek śmiertelności wynoszący 35% dla wszystkich analizowanych przypadków i sięgający 50% wśród chorych z STSS [87].

W przypadku około 3% niedoleczonych, przewlekłych lub nawracających infekcji gardła lub skóry dochodzi do występowania odległych w czasie nieropnych powikłań [18]. Powikłania w postaci gorączki reumatycznej (*acute rheumatic fever*, ARF) czy kłębuszkowego zapalenia nerek (*acute poststreptococcal glomerulonephritis*, APSGN) są wynikiem reakcji autoimmunologicznych na antygeny GAS. Gorączka reumatyczna stanowi wieloukładowy odczyn zapalny, występujący u młodych, podatnych osób w następstwie infekcji gardła. Autoimmunizacja stanowiąca podłoże ARF rozwija się w mechanizmie mimikry molekularnej. Podobieństwo epitopów antygenowych GAS i tkanek ludzkich powoduje, że wyzwolona przez paciorkowce humoralna i komórkowa odpowiedź immunologiczna zwraca się przeciw własnym tkankom gospodarza wywołując proces zapalny. Zmiany zapalne w strukturach serca występują u 40–60% chorych, u których wystąpiła gorączka reumatyczna [26]. Choroby serca wywołane powikłaniami po przebytych zakażeniu są jedną z głównych przyczyn zgonów związanych z infekcjami grupą A *Streptococcus*, a w niektórych krajach świata jak np. USA, powikłania po infekcjach GAS są najczęstszą przyczyną nabytych chorób serca u dzieci [9]. Leczenie penicyliną we wczesnym etapie rozwoju paciorkowcowej anginy może zapobiec temu powikłaniu.

Mechanizm powstawania kłębuszkowego zapalenia nerek jest nie do końca poznany. Wiadomo, że przyczyną uszkodzenia kłębuszków nerkowych jest odkładanie się w nich krążących we krwi kompleksów immunologicznych, w których skład wchodzi antygeny GAS i skierowane przeciw nim przeciwciała gospodarza oraz składowe dopełniacza [18]. Liczba zachorowań na APSGN

jest niska w krajach o wysokim statusie ekonomicznym, ale nadal wysoki poziom obserwuje się w krajach rozwijających się [9].

### 3. Czynniki wirulencji *S. pyogenes*

*S. pyogenes* koduje wiele, stale badanych, lecz ciągle nie do końca poznanych, czynników zjadliwości i posiada złożony mechanizm wywoływania zmian chorobowych. Umożliwiają one tej bakterii kolonizację organizmu gospodarza, obronę przed układem immunologicznym, rozprzestrzenianie się w zakażonym organizmie oraz niszczenie komórek i tkanek. Spośród wielu czynników zjadliwości, jakimi szczepy GAS dysponują, do najważniejszych należą te, które są związane z komórką bakterii, takie jak białko M wraz z białkami towarzyszącymi, białka wiążące fibronektynę, enzym C5a-peptydaza czy kwas hialuronowy. W patogenezie zakażeń *S. pyogenes* istotną rolę pełnią również wytwarzane przez ten drobnoustrój substancje pozakomórkowe, takie jak streptolizyna O i S, enzymy (proteazy, DNazy, streptokinaza), toksyny cytolityczne (hemolizyny) oraz toksyny pirogenne (egzotoksyny, superantygeny) [18]. Tabela II przedstawia podział czynników wirulencji GAS ze względu na ich funkcję w procesie patogenezy.

#### 3.1. Adhezyny

Pierwszym etapem infekcji jest kontakt pomiędzy bakteriami a komórkami gospodarza. Adhezja jest procesem o mechanizmie dwuetapowym, w którym w początkowej fazie zaangażowane są czynniki nieswoiste, związane z właściwościami fizykochemicznymi bakterii, takimi jak potencjał elektrostatyczny czy właściwości hydrofobowe [14]. Kluczową rolę w zjawisku, jakim jest adhezja, odgrywają jednak przede wszystkim interakcje specyficzne, w których pośredniczą obecne na powierzchni bakterii białka (adhezyny) warunkujące wysoką swoistość mechanizmów. Adhezyny wiążą się specyficznie z receptorami znajdującymi się na powierzchni komórek człowieka, którymi są często białka błonowe należące do super-rodziny integryn, a oddziaływanie między gospodarzem a patogenem może mieć charakter bezpośredni, albo przebiegać za pośrednictwem glikoprotein (fibronektyna, laminina, witronektyna) wchodzących w skład macierzy międzykomórkowej (*extracellular matrix*, ECM) [58].

Główną adhezyną, a jednocześnie głównym czynnikiem wirulencji GAS, jest opisane po raz pierwszy ponad 80 lat temu przez R. L a n c e f i e l d powierchniowe białko M [43]. Od momentu odkrycia jest przedmiotem intensywnych badań, a informacje o jego budowie i roli w patogenezie GAS są stale uzupełniane, między innymi dzięki poznaniu sekwencji całego genomu bakteryjnego

Tabela II

## Czynniki wirulencji GAS i ich rola w procesie patogenezy

Funkcja czynnika wirulencji	Czynnik wirulencji
Czynniki odpowiedzialne za adhezję	białko M kwasy lipotejchoiowe (LTA) białka wiążące fibronektynę i kolagen apolipoproteinaza ( <i>serum opacity factor</i> SOF)
Czynniki ograniczające fagocytozę i zaburzające działanie dopełniacza	otoczka z kwasu hialuronowego HA białko M peptydazy C5a, SpeB SIC DNazy (streptodornazy)
Czynniki degradujące chemokiny	peptydaza C5a ( <i>scpA</i> ), SpyCEP
Czynniki degradujące łańcuchy immunoglobulin	IdeS/MAC SpeB GRAB
Inwazyjne, czynniki degradujące składowe macierzy zewnątrzkomórkowej oraz tkanki	hialuronidaza streptokinaza leukocydyny enolaza SpeB
Czynniki ułatwiające ucieczkę z pułapek nukleofilowych	DNazy
Czynniki destabilizujące błony komórkowe	streptolizyny S i O fosfolipaza A2
Superantygeny	egzotoksyny pirogenne SPE różnych typów (A, B, C, G, H, I, J, K, L, M) SmeZ i SSA
Inne	antygen T, peptydoglikan ściany komórkowej (aktywuje alternatywną drogę dopełniacza) białka szoku cieplnego (Clp) białka kolagenopodobne (SclA i SclB)

wielu szczepów *S. pyogenes* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?term=Streptococcus%20pyogenes>). Białko M jest prawdopodobnie dzisiaj jednym z najlepiej opisanych czynników bakteryjnych odpowiedzialnych za zjadliwość. Jego złożona struktura, funkcja, właściwości immunochemiczne i zmienność antygenowa wydają się unikatowe [21].

Białko M ma  $\alpha$ -helikalną budowę, transportowane jest na zewnątrz komórki przez sortazę i kotwiczone w błonie i ścianie komórkowej bakterii przy pomocy C-końca. W jego budowie wyróżnia się cztery powtarzające się regiony od A do D, różniące się wielkością, sekwencją aminokwasów oraz poziomem zmienności. Najbardziej konserwatywne części to regiony C i D, odpowiednio z trzema i czterema powtórzeniami, za którymi znajdują się fragmenty położone w ścianie i błonie komórkowej: fragment C-końcowy, część hydrofobowa i region bogaty w prolinę i glicynę. Zmienny region B (*semi-variable region*, SVR) z pięcioma powtórzeniami jest położony tuż za wysoce zmienną częścią białka M (*hypervariable region*, HVR). Analiza struktury białka wykazała, że w jego budowie występują nieregularne strukturalne motywy typu „coiled coil” [54], które najprawdopodobniej wpływają na wiązanie

się do białka M fibrynogenu. Podobna, nieregularna budowa występuje w  $\alpha$ -helikalnych częściach białek takich jak miozyna, tropomiozyna, laminina, keratyna i vimentyna [21]. Składająca się z regionu A i części N-terminalnej, hiper-zmienny fragment jest najbardziej wysuniętą na zewnątrz komórki częścią białka. Opsonizujące przeciwciała rozpoznające białko M produkowane są głównie przeciwko temu epitopowi, a już drobne zmiany sekwencji aminokwasowej wpływają znacząco na specyficzność rozpoznawania tego regionu przez przeciwciała anty-M. Z tego powodu sekwencja aminokwasowa fragmentu HVR jest wyznacznikiem serotypu. Ze względu na niewygodę serotypowania przy użyciu surowic, opracowano metodę wyznaczania typu białka M poprzez sekwencjonowanie fragmentu genu kodującego region HVR. Obecnie znanych jest ponad 90 serotypów i ponad 200 *emm* typów białka M, a określone typy serologiczne odpowiadają typom genetycznym białka M [2]. Przeciwciała skierowane przeciwko białku M zabezpieczają przed ponownym zakażeniem GAS, są jednak serotypowo specyficzne, więc zakażenie określonym serotypem będzie zabezpieczało wyłącznie przed infekcją szczepami o takim samym serotypie [84]. Fragment HVR wydaje się być również związany

z obroną przeciw peptydom antybakteryjnym jak LL-37 i mCRAMP [44].

Główną funkcją, jaką w patogenezie zakażenia pełni białko M, jest zapobieganie fagocytozie przez leukocyty wielojądrzaste i makrofagi gospodarza. Unikanie fagocytozy przez GAS z udziałem białka M jest złożonym, nie do końca wyjaśnionym procesem, w który zaangażowane są zarówno region HVR, jak i część konserwatywna C. Uważa się, że paciorkowcowe białko M wiąże się z dwoma białkami regulującymi aktywację dopełniacza, z czynnikiem H (complement factor H, CFH) w regionie C i z białkiem FHL-1 (factor-H-like protein-1) w regionie HVR [66]. W wyniku tej interakcji następuje zakłócenie procesu fagocytozy na skutek degradacji cząsteczek C3b, będących opsoninami przyłączanymi do powierzchni bakterii w procesie alternatywnej aktywacji dopełniacza [6]. Po raz pierwszy interakcję pomiędzy białkami układu dopełniacza i *S. pyogenes* opisali H o r s t m a n n i wsp. Wykazali oni, że region C białka M *S. pyogenes* wiąże się z czynnikiem H [32]. Późniejsze badania nad szczepami serotypu M4 wykazały, że inny składnik klasycznej aktywacji układu dopełniacza, białko C4b, może być przyłączany do N-końcowego fragmentu białka M i efektywnie prowadzić do zaburzenia procesu fagocytozy [37]. Dodatkowo tak zwane *M-like proteins* mają zdolność wiązania czynnika C4a, będącego regulatorem drogi klasycznej aktywacji dopełniacza [66, 88].

Wiadomo również, że białko M wpływa na rozwój paciorkowcowego wstrząsu toksycznego. H e r w a l d i wsp. [28] zaobserwowali, że GAS po przedostaniu się do krwi osoby zakażonej, uwalnia z powierzchni białko M, które następnie poprzez swój region B tworzy duże konglomeraty z białkiem osocza, fibrynogenem. Powstałe w trakcie zakażenia kompleksy łączą się z  $\beta 2$  integrynami takimi jak CD11b/CD18) na powierzchni neutrofilów, doprowadzając do ich aktywacji. Dodatkowo białko M łączy się poprzez IgG z receptorem Fc $\gamma$ R2, co w końcowym efekcie prowadzi do zwiększonego uwalniania białka wiążącego heparynę (HBP), peptydu LL-37, albuminy i enzymów litycznych [21]. Uaktywnione leukocyty, wiążąc się z śródbłonkiem naczyń krwionośnych, doprowadzają do jego uszkodzenia. Efektem uszkodzenia śródbłonka jest nieszczelność naczyń, w czego konsekwencji następuje spadek ciśnienia tętniczego, wykrzepianie wewnątrznaczyniowe oraz uszkodzenia narządów. Są to objawy charakteryzujące wstrząs toksyczny. Po raz pierwszy kompleksy białko M-fibrynogen zidentyfikowano w materiale biopsyjnym pobranym od pacjenta z martwiczym zapaleniem powięzi i STSS [28].

Wyniki badań P å h l m a n a i wsp. [63], ponadto wykazały, że uwolnione do krwiobiegu białko M może bezpośrednio poprzez interakcję z receptorami błonowymi TLR2 (*Toll-like receptors 2*) aktywować monocyty

do produkcji cytokin pro-zapalnych. Pośrednia aktywacja monocytów następuje z kolei w wyniku oddziaływania HBP z integrynami na ich powierzchni. Białko M może dodatkowo wiązać się do integryn GPIIb/IIIa i receptora Fc $\gamma$ R2 na powierzchni trombocytów prowadząc do ich aktywacji, co wpływa nie tylko na agregację płytek i tworzenie skrzepów, ale również na dodatkowe pobudzenie monocytów i neutrofilów.

Adhezja GAS, w której pośredniczą dwie domeny białka M, konserwatywna i zmienna, zależy od jego typu serologicznego. Szczepy *S. pyogenes* o typie M1 i M3 mają zdolność wiązania fibronektyny, w której pośredniczy część zmienna białka M. Natomiast w przypadku szczepów o typie M6 w procesie adhezji bierze udział domena konserwowana białka M, a receptorem jest białko CD46 skórnych keratynocytów [14, 61]. Od dawno wiadomo, że niektóre serotypy białka M są nieprzypadkowo związane z pewnymi klinicznymi postaciami zakażeń GAS i pojawiają się w różnym czasie i w różnym geograficznym rozmieszczeniu. Na przykład szczepy GAS o serotypie M1 odpowiedzialne są za wiele różnych przypadków zakażeń inwazyjnych, które mogą mieć charakter epidemii w różnych regionach świata a szczepy M28 często powodują gorączkę połogową [24]. Wiele ciężkich postaci infekcji GAS, takich jak STSS i NF, jest powiązanych z występowaniem szczepów o serotypie M1 i M3 [4], natomiast za epidemie gorączki reumatycznej odpowiedzialne są szczepy GAS o serotypie M18 [80].

Pierwszą scharakteryzowaną adhezyną *S. pyogenes* był kwas lipoteichowy (*lipoteichoic acid*, LTA), który nadaje komórce właściwości hydrofobowe poprzez tworzenie kompleksów z białkiem M i białkami towarzyszącymi (*M-like proteins*) [16]. Przez wiele lat przypuszczano, że LTA wraz z białkiem M są jedynymi czynnikami odpowiedzialnym za przyleganie GAS do komórek eukariotycznych. Dzisiaj jednak wiadomo, że funkcję tę spełnia przynajmniej siedemnaście struktur powierzchniowych komórki bakteryjnej GAS. Pośród nich udokumentowaną rolę pełnią otoczek z kwasu hialuronowego oraz szereg innych białek takich jak F1, F2 i R28 [14].

Kodowane przez gen *prtF1*, odkryte w roku 1992 białko F1 posiada zdolność wiązania fibronektyny [14]. Ostatnie badania wykazały jego rolę w procesie wnikania GAS do wnętrza komórek nabłonkowych gospodarza. Wykazano, że większość *S. pyogenes* ulega internalizacji do wakuoli komórkowych w trakcie ich stacjonarnej fazy wzrostu. Znajdujące się we wnętrzu komórki bakterie mogą także stanowić rezerwar i potencjalne źródło nawrotu zakażenia [60, 77]. Dodatkowo taka lokalizacja osłabia możliwości zwalczania ich przez układ odpornościowy gospodarza oraz daje bakteriom dostęp do łożyska krwi [19].

Ważną adhezyną GAS, produkowaną przez ponad połowę serotypów *S. pyogenes*, jak również przez inne

gatunki paciorkowców i gronkowców jest apolipoproteinaza SOF (*serum opacity factor*) [17]. Nazwa SOF pochodzi od zdolności do wywoływania zmętnienia surowicy ssaków poprzez tworzenie dużych agregatów lipidowych. Ponadto udowodniono zdolność apolipoproteinazy do wiązania fibronektyny, fibrynogenu i fibuliny-1 [15], a rola jaką pełni jest ściśle powiązana z hamowaniem procesu fagocytozy [13].

### 3.2. Czynniki sprzyjające rozprzestrzenianiu się bakterii w organizmie gospodarza

Po wstępnym kontakcie komórek bakterii z tkankami gospodarza, rozpoczyna się ich rozprzestrzenianie w organizmie. W proces ten zaangażowany jest cały szereg czynników wirulencji, będących w większości enzymami hydrolitycznymi różnych klas, takimi jak hialuronidazy, proteazy, lipazy, kolagenazy i nukleazy. Bakteryjne proteiny, jako aktywne proteolityczne enzymy pozakomórkowe są bardzo istotnym czynnikiem zjadliwości, uczestniczącym w procesie rozprzestrzeniania się bakterii chorobotwórczych oraz destrukcji tkanek gospodarza. Mogą one także brać udział w procesie unikania przez bakterie swoistych i nieswoistych mechanizmów obronnych gospodarza oraz modulacji jego układu immunologicznego podczas zakażenia i stanu zapalnego. Wiele proteinaz bakteryjnych należących do klas takich jak proteazy serynowe, cysteinowe i asparaginowe może mieć znaczenie dla wyżej wymienionych zjawisk [89].

Rozprzestrzenianie się infekcji GAS w organizmie gospodarza jest możliwe przede wszystkim dzięki zdolności tej bakterii do degradacji elementów macierzy międzykomórkowej. Podstawowym enzymem odpowiedzialnym za degradację tkanek gospodarza jest proteaza cysteinowa SpeB [38]. Wytwarzana w toku zakażenia proteaza SpeB degradowuje fibronektynę i witronektynę, białka wchodzące w skład struktury macierzy pozakomórkowej gospodarza, istotne dla procesu homeostazy. Proteolityczna aktywacja ludzkich metaloproteaz macierzy międzykomórkowej prowadzona przez SpeB, pośrednio uczestniczy w masowych uszkodzeniach tkanek gospodarza, które są charakterystyczne dla martwiczego zapalenia powięzi i innych infekcji inwazyjnych GAS. Dodatkowo SpeB degradowuje kininogen do bradykininy, co powoduje zaburzenia w przepuszczalności naczyń krwionośnych będących jednym z objawów STSS. Proteaza SpeB posiada również aktywność wobec ludzkich immunoglobulin. Przeciwciała IgG są rozcinane na dwa fragmenty Fab i jeden Fc, co w znaczący sposób zaburza zarówno humoralną jak i komórkową odpowiedź immunologiczną gospodarza. Dodatkowa SpeB powoduje rozszczepienie COOH-końca ciężkiego łańcucha przeciwciała IgA, IgD i IgM na mniejsze fragmenty a w przypadku działania na ciężki łańcuch immunoglobuliny

IgE powoduje jej degradację. SpeB aktywuje natomiast interleukiny 6 i 8 oraz czynnik martwicy nowotworów [11]. Toksyna SpeB posiada także inne właściwości immunomodulacyjne takie jak aktywacja czynników prozapalnych wpływających na obraz infekcji *S. pyogenes*. Aktywuje interleukinę IL- $\beta$ , która jest silnym mediatorem zapalnym [12]. Prowadzone obserwacje pacjentów z różnym stopniem nasilenia choroby inwazyjnej GAS, takich jak na przykład róża, zapalenie tkanki łącznej, płuc, bakteriemia, septyczne zapalenie stawów, zespół wstrząsu toksycznego czy martwicze zapalenie powięzi wykazały, że wytwarzają oni zwiększoną ilość przeciwciał przeciw SpeB [52]. Sugeruje się też, że toksyna SpeB bierze udział w patogenezie APSGN wyzwalając proces zapalny w kłębuszkach nerkowych jeszcze przed akumulacją w nich kompleksów immunologicznych. Wykazano też, w surowicy pacjentów z APSGN zwiększony jest poziom przeciwciał anty-SpeB [56].

W przeciwieństwie do niespecyficznego działania SpeB, szereg proteaz wytwarzanych przez GAS oddziałuje z układem immunologicznym gospodarza w sposób wielce specyficzny. Najważniejszą z nich jest ScpA [94] – proteaza, która inaktywuje składnik C5a ludzkiego dopełniacza, co skutkuje obniżoną chemotaksją neutrofilów do miejsca zakażenia [35].

Białkiem aktywności zbliżonej do SpeB jest wydzielana do środowiska proteaza cysteinowa Mac/IdeS (*immunoglobulin G endopeptidase*). W sposób gatunkowo specyficzny odcina łańcuch ciężki ludzkiego IgG, co ogranicza fagocytozę [46]. Ma ona również zdolność blokowania receptorów dla neutrofilów, znajdujących się w części Fc przeciwciał już przyłączonych do komórki GAS. Mac/IdeS jest przy tym nieaktywna względem pozostałych klas immunoglobulin [46]. W proteomie *S. pyogenes* wyróżniono dwa warianty białka: IdeS/Mac-1 oraz Mac-2. Ocenia się, że obie formy alleliczne mają charakter bifunkcyjny, a jedynie w przypadku typu M28 GAS funkcja białka rozdzielona jest między endopeptydazę IgG (IdeS/Mac-1) oraz bloker receptorów w części Fc przeciwciał (Mac-2) [81]. Badania nad Mac/IdeS dotyczą również potencjalnego wykorzystania tej proteazy jako leku ukierunkowanego na leczenie schorzeń o charakterze autoimmunologicznym, wywołanych dużym stężeniem IgG krążącego we krwi po przebytej infekcji, a skierowanym przeciwko antygenom upodobnionym do ludzkich receptorów komórkowych. W ciągu 15 minut, 15 mikrogramów proteazy jest zdolne do kompletnej degradacji IgG zawartych w 1 ml ludzkiej krwi [36]. Przeprowadzone testy *in vivo* wskazują na doskonałe efekty leczenia kłębuszkowego zapalenia nerek, zarówno w odniesieniu do krążących w surowicy kompleksów immunologicznych, jak i też wobec tych odkładanych w kłębuszkach nerkowych [95].

Ważnym czynnikiem modulującym odpowiedź immunologiczną na infekcję GAS jest niedawno odkryta

zewnątrzkomórkowa proteaza degradująca chemokiny, SpyCEP/ScpC (*S. pyogenes cell envelope protease*). Podobnie do SpeB, SpyCEP jest zakotwiczona w ścianie komórkowej a w przypadku wysokiej produkcji znajduje się ją również poza komórką. SpyCEP wykazuje aktywność proteolityczną względem ludzkiej interleukiny 8 (IL8/CXCL8), a także innych tkankowych czynników chemotaktycznych, takich jak białko chemotaktyczne dla granulocytów 2 (*granulocyte chemotactic protein 2*, GCP-2/CXCL6), GRO $\beta$ /MIP-2 $\alpha$ /CXCL2 (*macrophage inflammatory protein 2-alpha, growth-related protein beta*) oraz GRO (*growth-related oncogene alpha*, GRO $\alpha$ /CXCL1) [41, 86]. Działanie SpyCEP obniża zdolność aktywacji neutrofilii i makrofagów, zabezpieczając tym samym komórki patogenu przed fagocytozą. SpyCEP jest czynnikiem typowym dla szczepów silnie inwazyjnych oraz zdolnych do głębokiego penetrowania tkanek gospodarza. Wpływ na wirulencję i zasięg uszkodzeń tkanki potwierdzony został w eksperymentach z użyciem mutantów izogenicznych *S. pyogenes*, jak również rekombinantów *Lactococcus lactis*, które po nabyciu genu kodującego SpyCEP powodowały w modelach zwierzęcych silnie inwazyjny przebieg zakażenia, z możliwością utrzymywania się patogenu w górnych drogach oddechowych, jak również penetracji do płuc [86].

Kolejnym białkiem, którego funkcja sprzyja zdolności blokowania układu immunologicznego gospodarza, jest SIC (*streptococcal inhibitor of complement-mediated lysis*). SIC nie jest proteazą, wiąże się z kompleksem C5b-C9 dopełniacza i blokuje jego końcową cytotoksyczną aktywność [1]. Wykazano, że produkcja SIC ma znaczący wpływ na przebieg kolonizacji śluzówek w mysim modelu infekcji, a bakterie pozbawione genu *sic* są znacznie gorszymi kolonizatorami [48]. Produkcja SIC ma również wpływ na adhezję, a być może również internalizację do komórek eukariotycznych [29].

Innymi enzymami uczestniczącymi w degradacji tkanek gospodarza są enolaza, streptokinaza i hialuronidaza. Hialuronidaza hydrolizuje kwas hialuronowy, będący składnikiem bazowym tkanki łącznej, przez co umożliwia atakowanie i rozkład tkanek miękkich w przebiegu zakażenia inwazyjnego [18]. Enolaza i streptokinaza działają jako receptory dla ludzkiego plazminogenu. W naturalnych warunkach, aktywacja plazminogenu i jego przemiana w aktywną proteazę serynową, czyli plazminę, to element kaskady przeciwzakrzepowej związanej z procesem gojenia ran, odnowy tkanek i angiogenezy [5]. Streptokinaza jest białkiem, które pozwala bakteriom wykorzystać naturalne procesy przebiegające w organizmie gospodarza w celu destrukcji tkanek. Na powierzchni komórki bakteryjnej streptokinaza formuje kompleks 1:1 z ludzkim (specyficzność gatunkowa) plazminogenem, co prowadzi do przemiany w aktywną formę. Po aktywacji, plazmina na powierzchni komórki GAS degraduje białka matriks,

błonę podstawną, kolagen i tkanki gospodarza, przez co wpływa na rozprzestrzenianie się bakterii w organizmie gospodarza. Inwazyjność ma wpływ na wywołanie się nieropnych powikłań. Produkcję streptokinazy łączy się z występowaniem kłębuszkowego zapalenia nerek, a wysoki poziom przeciwciał skierowanych przeciw enolazie wykrywany jest w przypadku choroby reumatycznej.

DNazy to kolejny element związany z ucieczką GAS przed układem immunologicznym gospodarza. Podczas początkowych etapów infekcji bakteryjnej, komórki układu immunologicznego ulegają lizie w miejscu infekcji, co w efekcie prowadzi do uwolnienia chromosomalnego DNA i utworzenia tzw. „pułapek nukleofilowych”. DNazy produkowane przez GAS pozwalają na hydrolizę chromosomalnego DNA i na uwolnienie się bakterii z tych pułapek, a następnie ich dalsze rozprzestrzenianie się poza początkowe miejsce infekcji [85].

### 3.3. Toksyny

Cechą charakterystyczną *S. pyogenes* jest produkcja szeregu toksyn, zaliczanych do dwóch klas: cytolizyn oraz toksyn pirogennych (superantygenów). Główne cytolizyny GAS to streptolizyna O i streptolizyna S, które odpowiedzialne są za tworzenie otworów w błonach komórkowych, a co za tym idzie, lizę komórek gospodarza. Bezpośrednim efektem działania streptolizyn jest hemoliza typu  $\beta$ , widoczna podczas wzrostu na podłożu wzbogaconym krwią [57].

Inną grupą toksyn destabilizujących błonę komórek eukariotycznych są fosfolipazy. W szczepach GAS zidentyfikowano fosfolipazę A2 (*streptococcal phospholipase A2*, Sla), opisaną po raz pierwszy dzięki analizie genomu serotypu M3 [4]. Wykazuje ona wysoki poziom podobieństwa strukturalnego do toksyny zawartej w jadzie australijskiego węża z gatunku *Pseudonaja textilis*. Zdolność do produkcji Sla związana jest bezpośrednio ze wzrostem zjadliwości szczepów GAS i miała najprawdopodobniej wpływ na klonalne rozprzestrzenianie się wysoce wirulentnych klonów serotypu M3 [79].

Niezwykle ważną rolę w patogenezie zakażeń GAS pełnią wytwarzane przez ten drobnoustrój paciorkowcowe egzotoksyny pirogenne (*streptococcal pyrogenic exotoxin*, Spes). Są one zewnątrzkomórkowymi białkami, w większości należącymi do dużej rodziny toksyn pirogennych o właściwościach superantygenów (*pyrogenic toxin superantigens*, PTSAs). Toksyny Spes są spokrewnione z wytwarzanymi przez *Staphylococcus aureus* PTSAs, do których należą toksyna wstrząsu toksycznego (*toxic shock syndrome toxin-1*, TSST-1) i gronkowcowe enterotoksyny [52]. Do superantygenów zalicza się toksyny, które powodują nadmierną mobilizację układu immunologicznego z pominięciem drogi klasycznej, wywołując niespecyficzną poliklonalną aktywację

limfocytów T [82]. Dzieje się tak dlatego, że toksyny te nie reagują z unikatowym miejscem wiążącym antygen, jakim jest kompleks TCR (T-cell receptor) i MHC (*major histocompatibility complex*) klasy II, ale przyłączają się bezpośrednio do zewnętrznej powierzchni receptora TCR (fragment zmienny łańcucha  $\beta$ ,  $V\beta$ ) i do zewnętrznej części cząsteczki MHC klasy II. W ten sposób pobudzone zostają liczne kłony limfocytów T (ok. 20%) o różnej swoistości antygenowej, których wspólną cechą jest region  $V\beta$  receptora TCR [52]. Aktywowane przez superantygeny limfocyty T uwalniają cytokiny prozapalne, takie jak czynnik martwicy nowotworu alfa, TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor alpha*), interleukiny IL-1 i IL-6 czy interferon gamma IFN- $\gamma$  (*interferone gamma*), które wydzielane w nadmiarze działają silnie uszkodzająco na tkanki ustroju, prowadząc do objawów wstrząsu toksycznego [20]. Co ciekawe, białko M działa nie tylko pozapalnie, ale również jako superantygen [64].

W chwili obecnej znanych jest ponad 11 superantygenów produkowanych przez *S. pyogenes*. Są to: paciorkowcowe egzotoksyny pirogenne SpeA, SpeC, SpeEF, SpeG, SpeH, SpeI, SpeJ, SpeK, SpeL, SpeM, paciorkowcowa egzotoksyna mitogenna Z (*streptococcal mitogenic exotoxin*, SmeZ) i paciorkowcowy superantygen (*streptococcal superantigen*, SSA). Geny kodujące je często zlokalizowane są w obrębie mobilnych elementów genetycznych [3]. Częstość występowania poszczególnych toksyn wykazuje ogromne zróżnicowanie w obrębie populacji *S. pyogenes* i może stanowić cechę diagnostyczną [8]. Niestety funkcja superantygenów w procesie patogenezy nie jest jeszcze dokładnie scharakteryzowana. Stosunkowo najlepiej poznane są toksyny SpeA i SmeZ, których wytwarzanie jest prawdopodobnie związane z zespołem wstrząsu toksycznego i płonicą (SpeA) [27, 96] oraz chorobą Kawasaki (SmeZ) [20].

Pierwszą opisaną toksyną *S. pyogenes* była toksyna SpeA [52]. Jej działanie wiązano początkowo z wystąpieniem gorączki oraz powstawaniem charakterystycznej wysypki w płonicy. W latach 80 XX wieku, zaczęto intensywnie monitorować pojawianie się inwazyjnych szczepów GAS, których wzmożoną zjadliwość kojarzono ze zdolnością do produkcji toksyn [68]. Schlievert i wsp. udowodnili, że wśród królików zainfekowanych izogenicznymi szczepami GAS, różniącymi się obecnością lub brakiem genu *speA* w fagu T12, STSS rozwinął się tylko u tych, którym podano szczepy GAS wytwarzające toksynę SpeA. Dodatkowo zaobserwowano, że podana królikom szczepionka zawierająca antygen SpeA chroniła je nie tylko przed wystąpieniem objawów STSS, ale również przed rozwojem martwicy mięśni i powięzi. Sugeruje to, że SpeA, choć nie jest jedyną toksyną odpowiedzialną za rozwój STSS, przeciwdziała gospodarza skierowane przeciw SpeA mogą odgrywać znaczącą rolę w zapobieganiu ciężkim postaciom infekcji GAS [72].

Także zakrojone na szeroką skalę badania epidemiologiczne wykazały, że spośród wszystkich toksyn pirogennych, toksyna SpeA ma szczególnie związek z wystąpieniem STSS. Zaobserwowano, że większość inwazyjnych szczepów GAS o serotypach M1 i M3, odpowiedzialnych za STSS, produkuje toksynę SpeA i posiada gen *speA* [27, 45, 72]. W analizie inwazyjnych szczepów GAS izolowanych na terenie Polski wykryto gen *speA* w 24% szczepów [87]. Dzisiaj wiadomo, że sytuacja jest bardziej złożona, a za inwazyjność paciorkowców grupy A odpowiada kompleksowe działanie wzajemnie uzupełniających się czynników zjadliwości [52].

Inną toksyną, która wraz z egzotoksyną SpeA ma związek z pojawianiem się STSS u pacjentów z ciężkimi zakażeniami GAS jest kodowana przez faga CS112 toksyna SpeC [22]. Jest to toksyna zdecydowanie mniej poznana w porównaniu z toksyną SpeA, między innymi z powodu jej słabej immunogenności i dużej niestabilności [53]. Toksyna SpeC jest związana z wieloma inwazyjnymi zakażeniami GAS i została opisana w epidemicznych szczepach o typie M18 odpowiedzialnych za gorączkę reumatyczną [73]. Wśród inwazyjnych szczepów izolowanych w Polsce *speC* występuje w aż 41.5% szczepów [87].

Wśród produkowanych przez GAS superantygenów na uwagę zasługuje po raz pierwszy wykryta w roku 1992 w inwazyjnych szczepach GAS o serotypie M3 toksyna SSA (*streptococcal superantigen*), kodowana przez bakteriofagowy gen *ssa*. Interesującym jest fakt, że gen ten wykazuje aż 60% homologii w sekwencji aminokwasowej z genem enterotoksyny gronkowcowej SE (*staphylococcal enterotoxin*) B i C [55].

Inna wytwarzana przez GAS toksyna pirogenna, SpeF, jest wielofunkcyjnym białkiem opisywanym wcześniej jako czynnik mitogenny (*mitogenic factor*, MF). Dzisiaj wiadomo, że spełnia on również funkcję superantygeny oraz posiada aktywność ciepłostajęcej nukleazy [34]. Sklonowana po raz pierwszy w roku 1993, kodowana przez gen umieszczony na chromosomie bakteryjnym toksyna SpeF nie wykazuje podobieństwa do żadnej toksyny i występuje tylko u *S. pyogenes* [97, 98]. Zaobserwowano związek pomiędzy poziomem uwalnianej toksyny SpeF i ciężkością zakażenia GAS. Poprzez badania fragmentów tkanek pobranych od pacjentów z zakażeniami skóry o etiologii *S. pyogenes*, wykazano, że toksyna SpeF była obecna we wszystkich ocenianych materiałach biopsyjnych, a profil uwalnianych cytokin oraz proliferacyjna odpowiedź na działanie SpeF był zależny od stopnia rozwoju stanu zapalnego w zainfekowanej przez GAS tkance gospodarza [59]. Istnieją też dane sugerujące, że ilość produkowanej przez GAS toksyny SpeF jest różna i zależna od typu białka M. Szczepy o typie M1 i M3, które są związane z zakażeniami inwazyjnymi produkują jej znacznie więcej niż pozostałe GAS o innych typach białka M [51].



#### 4. Regulacja ekspresji czynników wirulencji

Zdolność patogenu do syntezy określonych czynników wirulencji nie jest równoznaczna z opisem jego rzeczywistej zjadliwości. W świetle ostatnich badań, niezwykle istotny wpływ na procesy patogenezы wydają się mieć procesy regulujące ekspresję czynników wirulencji, zwłaszcza w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska.

U bakterii takich jak paciorkowce, gdzie nie występuje na dużą skalę kontrola regulacji poprzez alternatywne czynniki sigma, za regulację odpowiedzi na bodźce środowiskowe odpowiedzialne są głównie tak zwane systemy dwuskładnikowe (*Two Component Systems*, TCS). System taki składa się z kinazy, zakotwiczonej w błonie komórkowej, odbierającej sygnał ze środowiska i białka regulatorowego. Po odebraniu sygnału przez kinazę, którym może być na przykład zmiany stężenia jonów metali [25], następuje fosforylacja lub defosforylacja regulatorowego białka. Fosforylacja białka regulatorowego wpływa na zmianę jego konformacji i umożliwia przyłączanie (lub odłączanie) od regulowanych promotorów. Stopień komplikacji systemów przekazywania sygnału może wzrastać, a w kaskadzie regulacyjnej uczestniczą wtedy dodatkowe białka przekaźnikowe. Systemy z dodatkowymi składnikami noszą nazwę „*phosphorelay*” [69]. Strategia bezpośredniej reakcji na bodziec umożliwia wytwarzanie białek o charakterze adhezyn i inwazyj tylko w warunkach osiągnięcia docelowej niszy ekologicznej. Ich aktywacja związana może być z panującymi w danym momencie warunkami środowiskowymi, a także z sygnalizacją ze strony systemu *quorum sensing* i sygnałem przekazywanym przez inne systemy dwuskładnikowe.

W zsekwencjonowanych genomach GAS znaleziono do tej pory ponad 100 niezależnych regulatorów oraz 13 systemów dwuskładnikowych [78], których sieć regulatorowa nie jest jednak w pełni poznana. Głównym, i najlepiej poznany systemem kontrolującym wirulencję *S. pyogenes*, obecnym też w innych gatunkach paciorkowców, jest system CovRS (CsrRS) [47]. W wyniku wieloletnich badań stwierdzono, iż jest on odpowiedzialny za regulację wielu czynników wirulencji takich jak otoczka z kwasu hialuronowego, białka wiążące kolagen, proteazy (Mac, SpeB, ScpA, SpyCEP), DNazy i streptolizyna S [23, 90]. System ten jest jednym z nielicznych, dla których zidentyfikowano sygnał środowiskowy, w postaci stężenia dwuwartościowych jonów magnezu [25].

Drugim po CovRS systemem dwuskładnikowym GAS, którego funkcję udało się ustalić jest system Ihk/Irr. System ten bierze udział w regulacji ekspresji genów odpowiedzialnych za inwazję leukocytów wielojądrowych i obronę przed fagocytozą przez komórki układu immunologicznego [92, 93]. System ten reguluje geny

zaangażowane w wirulencję (adhezyny, streptolizyna S, DNazy), jak również geny związane z odpowiedzią na stres oksydacyjny i syntezą ściany komórkowej [93].

Trzecim historycznie rozpoznany systemem GAS o znanej funkcji jest FasBCA. Jest on dość nietypowy, ponieważ w jego skład wchodzi dwie kinazy, FasB i FasC oraz regulator FasA, przy czym cały mechanizm regulacyjny wymaga dodatkowej obecności regulatorowego RNA; *fasX*. System ten kontroluje ekspresję streptokinazy, streptolizyny S oraz białek wiążących fibronektynę [39].

Dzięki systematycznej analizie systemów regulatorowych GAS, poznano sieci regulatorowe i potencjalną funkcję kolejnych systemów, spośród których system M5005\_Spy\_0680/0681 (spy0874/0875, sptRS) ma wpływ na ekspresję wielu czynników wirulencji i jest odpowiedzialny za regulację metabolizmu złożonych wielocukrów [76, 78]. Inne systemy, których funkcja została poznana dzięki systematycznym analizom transkrypcyjnym to M5005\_Spy\_0830/0831 (regulacja metabolizmu maleinianu), M5005\_Spy\_0784/0785 (regulacja transportu mannozy/fruktozy) oraz system M5005\_Spy\_1280/1281 (regulacja genów w fazie stacjonarnej) [78].

W regulacji wirulencji i odpowiedzi na warunki zewnętrzne, biorą również udział, tzw. *stand alone response regulators*, czyli regulatory, które zachowują się jak klasyczne geny regulatorowe odpowiadające na sygnał, przy czym nie udało się jak do tej pory wykryć specyficznej kinazy, która je fosforyluje/defosforyluje [40]. Mogą one pełnić funkcje nadrzędne lub podrzędne w stosunku do systemów dwuskładnikowych tzn. regulować lub być regulowane przez TCS, co dodatkowo komplikuje sieci regulatorowe.

W chwili obecnej, najlepiej scharakteryzowanym regulatorem jest regulator Mga (*multiple gene regulator of GAS*), który wpływa na ekspresję wielu adhezyn, włączając w to białko M, białka *M-like* typu Mrp, Enn, FcR, wzrost w postaci biofilmu, peptydazy C5a oraz SIC. Funkcja Mga jest związana z regulacją genów podczas fazy szybkiego wzrostu, co odzwierciedla warunki podczas inwazji tkanek i rozprzestrzeniania się bakterii w organizmie gospodarza. Zmiany w ekspresji Mga obserwowane były również w reakcji na podniesiony poziom CO<sub>2</sub>, wahania temperatury i obniżone stężenie jonów żelazowych. Nie stwierdzono natomiast, czy jest to wpływ bezpośredni, czy warunkowany kaskadą regulacją działającą przez inne czynniki jak np. TCS. Szacuje się, iż Mga może modulować ekspresję nawet 10% genomu GAS [31].

Kolejnymi regulatorami związanymi z wirulencją są białka RofA i Nra, należące do tzw. rodziny RALP (*RofA like proteins*), a także białko Rgg (RopB). Ostatnie badania nad Rgg również wskazują, iż jest to niezwykle ważny element interakcji pomiędzy patogenem a gospodarzem [10].

Białka rodziny RALP, podobnie jak Mga, związane są z regulacją ekspresji adhezyn, streptolizyny S, SpeA i SpeB, wpływają również na ekspresję innych regulatorów, w tym zwrotną regulację Mga, CovRS, Ihk/Irr i FasBCA [40].

W przypadku wirulencji GAS, często obserwuje się istotny wpływ regulatorów pozornie z nią niezwiązanych. Dobrym przykładem może być rola regulatora metabolizmu jonów MtsR, jako molekularnego przełącznika pomiędzy inwazyjną a łagodną formą zakażenia [62] lub metabolicznego regulatora CcpA [75].

Niedawno odkryto również u *S. pyogenes* regulatorowe cząsteczki RNA, które mają wpływ na regulację wirulencji, wspomniane wcześniej, *fasX* [39], oraz *rivX* [70] i *pel* [49]. Analizy przy użyciu mikromacierzy pozwoliły na identyfikację ponad 70 nowych regulatorowych RNA o nieznanym jak dotąd funkcji [67, 91], które potencjalnie mogą być zaangażowane w regulację wirulencji.

Poza typową regulacją transkrypcji, istotne znaczenie adaptacyjne mają także mutacje w obrębie genów regulatorowych. Charakterystyka szczepów wywołujących STSS wykazała, że w 57,3% posiadały one mutacje w genach systemu CovRS i Rgg, skutkujące m.in. nadprodukcją streptolizyny O lub brakiem produkcji SpeB. Dla kontrastu, podobny genotyp występował jedynie w przypadku 1,7% izolatów nieinwazyjnych [33].

## Podsumowanie

*S. pyogenes* jest drobnoustrojem chorobotwórczym powodującym zakażenia o różnej intensywności. Wysoka zapadalność we wszystkich regionach świata, wysoki odsetek infekcji o ciężkim przebiegu oraz dotkliwość powikłań poinfekcyjnych, sprawiają, że zaliczyć go należy do groźnych ludzkich patogenów.

W procesy adhezji do komórek gospodarza, ekspansji i kolonizacji tkanek, zaangażowany jest szereg specyficznych czynników zjadliwości i inwazyjności. Najważniejszym z nich, a przy tym najlepiej opisanym, jest białko M, którego złożona struktura, funkcja, właściwości immunochemiczne i zmienność antygenowa wydają się unikatowe. Wiadomo również, że ważną rolę w patogenezie zakażeń o przebiegu ostrym odgrywają paciorkowcowe egzotoksyny pirogenne, inwazyjny oraz czynniki o charakterze proteaz i DNaz. Kontrola poziomu ich ekspresji odbywa się z udziałem złożonych sieci regulacyjnych, obejmujących pojedyncze białka regulatorowe oraz wielokomponentowe systemy przekazywania sygnału.

## Podziękowania

Artykuł powstał dzięki finansowemu wsparciu z grantów NCN N N401 536140 (dla W.H.) oraz N N401 535940 (dla I.S.), środków z działalności statutowej NIL DS.5.82 i DS 5.67 (dla I.S.), oraz Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków (NPOA-Moduł)

## Literatura

1. Akesson P., Sjöholm A.G., Björck L.: Protein SIC, a novel extracellular protein of *Streptococcus pyogenes* interfering with complement function. *J. Biol. Chem.* **271**, 1081–1088 (1996)
2. Beall B., Facklam R., Thompson T.: Sequencing emm-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 953–958 (1996)
3. Beres S.B., Musser J.M.: Contribution of exogenous genetic elements to the group A *Streptococcus* metagenome. *PLoS One*, **2**, e800 (2007)
4. Beres S.B., Sylva G.L., Barbian K.D., Lei B., Hoff J.S., Mammarella N.D., Liu M.Y., Smoot J.C., Porcella S.F., Parkins L.D., Campbell D.S., Smith T.M., McCormick J.K., Leung D.Y., Schlievert P.M., Musser J.M.: Genome sequence of a serotype M3 strain of group A *Streptococcus*: phage-encoded toxins, the high-virulence phenotype, and clone emergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 10078–10083 (2002)
5. Bergmann S., Hammerschmidt S.: Fibrinolysis and host response in bacterial infections. *Thromb. Haemost.* **98**, 512–520 (2007)
6. Bisno A.: *Streptococcus pyogenes*. W: *Principles and Practice of Infectious Diseases*, ed. 6 (2005)
7. Bisno A.L., Stevens D.L.: Streptococcal infections of skin and soft tissues. *N. Engl. J. Med.* **334**, 240–245 (1996)
8. Borek A.L., Wilemska J., Izdebski R., Hryniewicz W., Sitkiewicz I.: A new rapid and cost-effective method for detection of phages, ICEs and virulence factors encoded by *Streptococcus pyogenes*. *Pol. J. Microbiol.* **60**, 187–201 (2011)
9. Carapetis J.R., Steer A.C., Mulholland E.K., Weber M.: The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet. Infect. Dis.* **5**, 685–94 (2005)
10. Carroll R.K., Shelburne S.A., 3rd, Olsen R.J., Suber B., Sahasrabhojane P., Kumaraswami M., Beres S.B., Shea P.R., Flores A.R., Musser J.M.: Naturally occurring single amino acid replacements in a regulatory protein alter streptococcal gene expression and virulence in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 1956–1968 (2011)
11. Chiang-Ni C. i Wu J. J.: Effects of streptococcal pyrogenic exotoxin B on pathogenesis of *Streptococcus pyogenes*. *J. Formos. Med. Assoc.* **107**, 677–685 (2008)
12. Collin M., Olsen A.: Extracellular enzymes with immunomodulating activities: variations on a theme in *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* **71**, 2983–2992 (2003)
13. Courtney H.S., Hasty D.L., Dale J.B.: Anti-phagocytic mechanisms of *Streptococcus pyogenes*: binding of fibrinogen to M-related protein. *Mol. Microbiol.* **59**, 936–947 (2006)
14. Courtney H.S., Hasty D.L. i Dale J.B.: Molecular mechanisms of adhesion, colonization, and invasion of group A streptococci. *Ann. Med.* **34**, 77–87 (2002)
15. Courtney H.S., Li Y., Twal W.O., Argraves W.S.: Serum opacity factor is a streptococcal receptor for the extracellular matrix protein fibulin-1. *J. Biol. Chem.* **284**, 12966–12971 (2009)
16. Courtney H.S., Ofek I., Penfound T., Nizet V., Pence M.A., Kreikemeyer B., Podbielski A., Hasty D.L., Dale J.B.: Relationship between expression of the family of M proteins and lipoteichoic acid to hydrophobicity and biofilm formation in *Streptococcus pyogenes*. *PLoS One*, **4**, e4166 (2009)
17. Courtney H.S., Pownall H.J.: The structure and function of serum opacity factor: a unique streptococcal virulence determinant that targets high-density lipoproteins. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 956071 (2010)
18. Cunningham M.W.: Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 470–511 (2000)
19. Efstratiou A., Sriskandan S., Lamagni T.: What more A.  $\beta$ -haemolytic streptococci. W: *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*, ed. 2 (2006)

20. Fraser J., Arcus V., Kong P., Baker E., Proft T.: Superantigens – powerful modifiers of the immune system. *Mol. Med. Today*, **6**, 125–132 (2000)
21. Ghosh P.: The nonideal coiled coil of M protein and its multifarious functions in pathogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **715**, 197–211 (2011)
22. Goshorn S.C., Schlievert P.M.: Bacteriophage association of streptococcal pyrogenic exotoxin type C. *J. Bacteriol.* **171**, 3068–3073 (1989)
23. Graham M.R., Smoot L.M., Migliaccio C.A., Virtaneva K., Sturdevant D.E., Porcella S.F., Federle M.J., Adams G.J., Scott J.R. i Musser J.M.: Virulence control in group A *Streptococcus* by a two-component gene regulatory system: global expression profiling and *in vivo* infection modeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 13855–13860 (2002)
24. Green N.M., Zhang S., Porcella S.F., Nagiec M.J., Barbian K.D., Beres S.B., LeFebvre R.B., Musser J.M.: Genome sequence of a serotype M28 strain of group A *Streptococcus*: potential new insights into puerperal sepsis and bacterial disease specificity. *J. Infect. Dis.* **192**, 760–770 (2005)
25. Gryllos I., Grifantini R., Colaprico A., Jiang S., Deforce E., Hakansson A., Telford J.L., Grandi G., Wessels M.R.: Mg(2+) signalling defines the group A streptococcal CsrRS (CovRS) regulon. *Mol. Microbiol.* **65**, 671–683 (2007)
26. Guilherme L., Kalil J., Cunningham M.: Molecular mimicry in the autoimmune pathogenesis of rheumatic heart disease. *Autoimmunity*, **39**, 31–39 (2006)
27. Hauser A.R., Stevens D.L., Kaplan E.L., Schlievert P.M.: Molecular analysis of pyrogenic exotoxins from *Streptococcus pyogenes* isolates associated with toxic shock-like syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 1562–1567 (1991)
28. Herwald H., Cramer H., Morgelin M., Russell W., Sollenberg U., Norrby-Teglund A., Flodgaard H., Lindbom L., Bjorck L.: M protein, a classical bacterial virulence determinant, forms complexes with fibrinogen that induce vascular leakage. *Cell*, **116**, 367–379 (2004)
29. Hoe N.P., Ireland R.M., DeLeo F.R., Gowen B.B., Dorward D.W., Voyich J.M., Liu M., Burns E.H., Jr., Culnan D.M., Bretscher A., Musser J.M.: Insight into the molecular basis of pathogen abundance: group A *Streptococcus* inhibitor of complement inhibits bacterial adherence and internalization into human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 7646–7651 (2002)
30. Hoge C.W., Schwartz B., Talkington D.F., Breiman R.F., MacNeill E.M., Englender S.J.: The changing epidemiology of invasive group A streptococcal infections and the emergence of streptococcal toxic shock-like syndrome. A retrospective population-based study. *JAMA*, **269**, 384–389 (1993)
31. Hondorp E.R., McIver K.S.: The Mga virulence regulon: infection where the grass is greener. *Mol. Microbiol.* **66**, 1056–1065 (2007)
32. Horstmann R.D., Sievertsen H.J., Knobloch J., Fischetti V.A.: Antiphagocytic activity of streptococcal M protein: selective binding of complement control protein factor H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1657–1661 (1988)
33. Ikebe T., Ato M., Matsumura T., Hasegawa H., Sata T., Kobayashi K., Watanabe H.: Highly frequent mutations in negative regulators of multiple virulence genes in group A streptococcal toxic shock syndrome isolates. *PLoS Pathog.* **6**, e1000832 (2010)
34. Iwasaki M., Igarashi H., Yutsudo T.: Mitogenic factor secreted by *Streptococcus pyogenes* is a heat-stable nuclease requiring His122 for activity. *Microbiology*, **143** (Pt 7), 2449–2455 (1997)
35. Ji Y., McLandsborough L., Kondagunta A., Cleary P.P.: C5a peptidase alters clearance and trafficking of group A streptococci by infected mice. *Infect. Immun.* **64**, 503–510 (1996)
36. Johansson B.P., Shannon O., Bjorck L.: IdeS: a bacterial proteolytic enzyme with therapeutic potential. *PLoS One*, **3**, e1692 (2008)
37. Johnsson E., Thern A., Dahlback B., Heden L.O., Wikstrom M. i Lindahl G.: A highly variable region in members of the streptococcal M protein family binds the human complement regulator C4BP. *J. Immunol.* **157**, 3021–3029 (1996)
38. Kapur V., Topouzis S., Majesky M.W., Li L.L., Hamrick M.R., Hamill R.J., Patti J.M. i Musser J.M.: A conserved *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease cleaves human fibronectin and degrades vitronectin. *Microb. Pathog.* **15**, 327–346 (1993)
39. Kreikemeyer B., Boyle M.D., Buttaro B.A., Heinemann M., Podbielski A.: Group A streptococcal growth phase-associated virulence factor regulation by a novel operon (Fas) with homologies to two-component-type regulators requires a small RNA molecule. *Mol. Microbiol.* **39**, 392–406 (2001)
40. Kreikemeyer B., McIver K.S., Podbielski A.: Virulence factor regulation and regulatory networks in *Streptococcus pyogenes* and their impact on pathogen-host interactions. *Trends Microbiol.* **11**, 224–232 (2003)
41. Kurupati P., Turner C.E., Tziona I., Lawrenson R.A., Alam F.M., Nohadani M., Stamp G.W., Zinkernagel A.S., Nizet V., Edwards R.J., Sriskandan S.: Chemokine-cleaving *Streptococcus pyogenes* protease SpyCEP is necessary and sufficient for bacterial dissemination within soft tissues and the respiratory tract. *Mol. Microbiol.* **76**, 1387–1397 (2010)
42. Lamagni T.L., Neal S., Keshishian C., Powell D., Potz N., Pebody R., George R., Duckworth G., Vuopio-Varkila J., Efstratiou A.: Predictors of death after severe *Streptococcus pyogenes* infection. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 1304–1307 (2009)
43. Lancefield R.C.: The Antigenic Complex of Streptococcus Haemolyticus: I. Demonstration of a Type-Specific Substance in Extracts of *Streptococcus haemolyticus*. *J. Exp. Med.* **47**, 91–103 (1928)
44. Lauth X., von Kockritz-Blickwede M., McNamara C.W., Myskowski S., Zinkernagel A.S., Beall B., Ghosh P., Gallo R.L., Nizet V.: M1 protein allows Group A streptococcal survival in phagocyte extracellular traps through cathelicidin inhibition. *J. Innate Immun.* **1**, 202–214 (2009)
45. Lee P.K., Schlievert P.M.: Quantification and toxicity of group A streptococcal pyrogenic exotoxins in an animal model of toxic shock syndrome-like illness. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 1890–1892 (1989)
46. Lei B., DeLeo F.R., Hoe N.P., Graham M.R., Mackie S.M., Cole R.L., Liu M., Hill H.R., Low D.E., Federle M.J., Scott J.R., Musser J.M.: Evasion of human innate and acquired immunity by a bacterial homolog of CD11b that inhibits opsonophagocytosis. *Nat. Med.* **7**, 1298–1305 (2001)
47. Levin J.C., Wessels M.R.: Identification of csrR/csrS, a genetic locus that regulates hyaluronic acid capsule synthesis in group A *Streptococcus*. *Mol. Microbiol.* **30**, 209–219 (1998)
48. Lukomski S., Hoe N.P., Abdi I., Rurangirwa J., Kordari P., Liu M., Dou S.J., Adams G.G., Musser J.M.: Nonpolar inactivation of the hypervariable streptococcal inhibitor of complement gene (sic) in serotype M1 *Streptococcus pyogenes* significantly decreases mouse mucosal colonization. *Infect. Immun.* **68**, 535–542 (2000)
49. Mangold M., Siller M., Roppenser B., Vlaminckx B.J., Penfound T.A., Klein R., Novak R., Novick R.P., Charpentier E.: Synthesis of group A streptococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *Mol. Microbiol.* **53**, 1515–1527 (2004)
50. Martin J.M., Green M.: Group A streptococcus. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* **17**, 140–148 (2006)
51. Matsumoto M., Ishikawa N., Saito M., Shibayama K., Horii T., Sato K., Ohta M.: Streptococcal pyrogenic exotoxin F (SpeF) causes permeabilization of lung blood vessels. *Infect. Immun.* **67**, 4307–4311 (1999)

52. McCormick J.K., Peterson M.L.P., Schlievert M.: Toxins and superantigens of group A streptococci. W: *Gram-Positive Pathogens*, ed. 2 (2006)
53. McGregor K.F., Spratt B.G., Kalia A., Bennett A., Bilek N., Beall B., Bessen D.E.: Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* representing most known emm types and distinctions among subpopulation genetic structures. *J. Bacteriol.* **186**, 4285–4294 (2004)
54. McNamara C., Zinkernagel A. S., Macheboeuf P., Cunningham M.W., Nizet V., Ghosh P.: Coiled-coil irregularities and instabilities in group A *Streptococcus* M1 are required for virulence. *Science*, **319**, 1405–1408 (2008)
55. Mollick J.A., Miller G.G., Musser J.M., Cook R.G., Grossman D., Rich R.R.: A novel superantigen isolated from pathogenic strains of *Streptococcus pyogenes* with aminoterminal homology to staphylococcal enterotoxins B and C. *J. Clin. Invest.* **92**, 710–719 (1993)
56. Mosquera J., Romero M., Viera N., Rincon J., Pedraza A.: Could streptococcal erythrogenic toxin B induce inflammation prior to the development of immune complex deposits in post-streptococcal glomerulonephritis? *Nephron. Exp. Nephrol.* **105**, e41–44 (2007)
57. Nizet V.: Streptococcal beta-hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis. *Trends. Microbiol.* **10**, 575–580 (2002)
58. Nobbs A.H., Lamont R.J., Jenkinson H.F.: *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 407–450 (2009)
59. Norrby-Teglund A., Thulin P., Gan B.S., Kotb M., McGeer A., Andersson J., Low D.E.: Evidence for superantigen involvement in severe group A streptococcal tissue infections. *J. Infect. Dis.* **184**, 853–860 (2001)
60. Ogawa T., Terao Y., Okuni H., Ninomiya K., Sakata H., Ikebe K., Maeda Y., Kawabata S.: Biofilm formation or internalization into epithelial cells enable *Streptococcus pyogenes* to evade antibiotic eradication in patients with pharyngitis. *Microb. Pathog.* **51**, 58–68 (2011)
61. Okada N., Liszewski M.K., Atkinson J.P., Caparon M.: Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A *Streptococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2489–2493 (1995)
62. Olsen R.J., Sitkiewicz I., Ayeras A.A., Gonulal V.E., Cantu C., Beres S.B., Green N.M., Lei B., Humbird T., Greaver J., Chang E., Ragasa W.P., Montgomery C.A., Cartwright J., Jr., McGeer A., Low D.E., Whitney A.R., Cagle P.T., Blasdel T.L., DeLeo F.R., Musser J.M.: Decreased necrotizing fasciitis capacity caused by a single nucleotide mutation that alters a multiple gene virulence axis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 888–893 (2010)
63. Pahlman L.I., Morgelin M., Eckert J., Johansson L., Russell W., Riesbeck K., Soehnlein O., Lindbom L., Norrby-Teglund A., Schumann R.R., Björck L., Herwald H.: Streptococcal M protein: a multipotent and powerful inducer of inflammation. *J. Immunol.* **177**, 1221–1228 (2006)
64. Pahlman L. I., Olin A. I., Darenberg J., Morgelin M., Kotb M., Herwald H. i Norrby-Teglund A.: Soluble M1 protein of *Streptococcus pyogenes* triggers potent T cell activation. *Cell. Microbiol.* **10**, 404–414 (2008)
65. Pasternack M., Morton N.: Skin and soft tissue infection. W: *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, ed. 7 (2009)
66. Perez-Caballero D., Garcia-Laorden I., Cortes G., Wessels M.R., de Cordoba S.R., Alberti S.: Interaction between complement regulators and *Streptococcus pyogenes*: binding of C4b-binding protein and factor H/factor H-like protein 1 to M18 strains involves two different cell surface molecules. *J. Immunol.* **173**, 6899–6904 (2004)
67. Perez N., Trevino J., Liu Z., Ho S.C., Babitzke P., Sumbly P.: A genome-wide analysis of small regulatory RNAs in the human pathogen group A *Streptococcus*. *PLoS One*, **4**, e7668 (2009)
68. Proft T., Sriskandan S., Yang L. i Fraser J.D.: Superantigens and streptococcal toxic shock syndrome. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 1211–1218 (2003)
69. Raghavan V., Groisman E.A.: Orphan and hybrid two-component system proteins in health and disease. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 226–231 (2008)
70. Roberts S.A., Scott J.R.: RivR and the small RNA RivX: the missing links between the CovR regulatory cascade and the Mga regulon. *Mol. Microbiol.* **66**, 1506–1522 (2007)
71. Ruoff K.L.: *Streptococcal Diseases*. W: *Toply and Wilson's Microbiology and microbial infections*, 257–275 ed. 9 (1998)
72. Schlievert P.M., Kotb M.Y., Stevens D.L.: Streptococcal superantigens: streptococcal toxic shock syndrome. W: *Effect of microbes on the immune system*, 25–39 ed. (2000)
73. Schmitz F.J., Beyer A., Charpentier E., Normark B.H., Schade M., Fluit A.C., Hafner D., Novak R.: Toxin-gene profile heterogeneity among endemic invasive European group A streptococcal isolates. *J. Infect. Dis.* **188**, 1578–1586 (2003)
74. Shaikh N., Leonard E., Martin J.M.: Prevalence of streptococcal pharyngitis and streptococcal carriage in children: a meta-analysis. *Pediatrics*, **126**, e557–564 (2010)
75. Shelburne S.A., 3rd, Keith D., Horstmann N., Sumbly P., Davenport M.T., Graviss E.A., Brennan R.G., Musser J.M.: A direct link between carbohydrate utilization and virulence in the major human pathogen group A *Streptococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 1698–1703 (2008)
76. Shelburne S.A., 3rd, Sumbly P., Sitkiewicz I., Granville C., DeLeo F.R., Musser J.M.: Central role of a bacterial two-component gene regulatory system of previously unknown function in pathogen persistence in human saliva. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 16037–16042 (2005)
77. Siemens N., Patenge N., Otto J., Fiedler T., Kreikemeyer B.: *Streptococcus pyogenes* M49 Plasminogen/Plasmin Binding Facilitates Keratinocyte Invasion via Integrin-Integrin-linked Kinase (ILK) Pathways and Protects from Macrophage Killing. *J. Biol. Chem.* **286**, 21612–21622 (2011)
78. Sitkiewicz I., Musser J.M.: Expression microarray and mouse virulence analysis of four conserved two-component gene regulatory systems in group A *Streptococcus*. *Infect. Immun.* **74**, 1339–1351 (2006)
79. Sitkiewicz I., Nagiec M.J., Sumbly P., Butler S.D., Cywes-Bentley C., Musser J.M.: Emergence of a bacterial clone with enhanced virulence by acquisition of a phage encoding a secreted phospholipase A2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 16009–16014 (2006)
80. Smoot J.C., Barbian K.D., Van Gompel J.J., Smoot L.M., Chaussee M.S., Sylva G.L., Sturdevant D.E., Ricklefs S.M., Porcella S.F., Parkins L.D., Beres S.B., Campbell D.S., Smith T.M., Zhang Q., Kapur V., Daly J.A., Veasy L.G., Musser J.M.: Genome sequence and comparative microarray analysis of serotype M18 group A *Streptococcus* strains associated with acute rheumatic fever outbreaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 4668–4673 (2002)
81. Soderberg J.J., Engstrom P., von Pawel-Rammingen U.: The intrinsic immunoglobulin g endopeptidase activity of streptococcal Mac-2 proteins implies a unique role for the enzymatically impaired Mac-2 protein of M28 serotype strains. *Infect. Immun.* **76**, 2183–2188 (2008)
82. Sriskandan S., Faulkner L., Hopkins P.: *Streptococcus pyogenes*: Insight into the function of the streptococcal superantigens. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **39**, 12–19 (2007)

83. Steer A.C., Danchin M. H., Carapetis J. R.: Group A streptococcal infections in children. *J. Paediatr. Child. Health.* **43**, 203–213 (2007)
84. Steer A.C., Law I., Matatolu L., Beall B.W., Carapetis J.R.: Global emm type distribution of group A streptococci: systematic review and implications for vaccine development. *Lancet Infect. Dis.* **9**, 611–616 (2009)
85. Sumbly P., Barbian K.D., Gardner D.J., Whitney A.R., Welty D.M., Long R.D., Bailey J.R., Parnell M.J., Hoe N.P., Adams G.G., Deleo F.R., Musser J.M.: Extracellular deoxyribonuclease made by group A *Streptococcus* assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 1679–1684 (2005)
86. Sumbly P., Zhang S., Whitney A.R., Falugi F., Grandi G., Graviss E.A., Deleo F.R., Musser J.M.: A chemokine-degrading extracellular protease made by group A *Streptococcus* alters pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Infect. Immun.* **76**, 978–985 (2008)
87. Szczypa K., Sadowy E., Izdebski R., Strakova L., Hryniewicz W.: Group A streptococci from invasive-disease episodes in Poland are remarkably divergent at the molecular level. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 3975–3979 (2006)
88. Thern A., Stenberg L., Dahlback B., Lindahl G.: Ig-binding surface proteins of *Streptococcus pyogenes* also bind human C4b-binding protein (C4BP), a regulatory component of the complement system. *J. Immunol.* **154**, 375–386 (1995)
89. Travis J., Potempa J., Maeda H.: Are bacterial proteinases pathogenic factors? *Trends Microbiol.* **3**, 405–407 (1995)
90. Trevino J., Perez N., Ramirez-Pena E., Liu Z., Shelburne S.A., 3rd, Musser J.M., Sumbly P.: CovS simultaneously activates and inhibits the CovR-mediated repression of distinct subsets of group A *Streptococcus* virulence factor-encoding genes. *Infect. Immun.* **77**, 3141–3149 (2009)
91. Trevino J., Perez N., Sumbly P.: The 4.5S RNA component of the signal recognition particle is required for group A *Streptococcus* virulence. *Microbiology*, **156**, 1342–1350 (2010)
92. Voyich J.M., Braughton K.R., Sturdevant D.E., Vuong C., Kobayashi S.D., Porcella S.F., Otto M., Musser J.M., DeLeo F.R.: Engagement of the pathogen survival response used by group A *Streptococcus* to avert destruction by innate host defense. *J. Immunol.* **173**, 1194–1201 (2004)
93. Voyich J.M., Sturdevant D.E., Braughton K.R., Kobayashi S.D., Lei B., Virtaneva K., Dorward D.W., Musser J.M., DeLeo F.R.: Genome-wide protective response used by group A *Streptococcus* to evade destruction by human polymorphonuclear leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 1996–2001 (2003)
94. Wexler D.E., Chenoweth D.E., Cleary P.P.: Mechanism of action of the group A streptococcal C5a inactivator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 8144–8148 (1985)
95. Yang R., Otten M.A., Hellmark T., Collin M., Bjorck L., Zhao M.H., Daha M.R., Segelmark M.: Successful treatment of experimental glomerulonephritis with IdeS and EndoS, IgG-degrading streptococcal enzymes. *Nephrol. Dial. Transplant.* **25**, 2479–2486 (2010)
96. Yu C.E., Ferretti J.J.: Molecular epidemiologic analysis of the type A streptococcal exotoxin (erythrogenic toxin) gene (speA) in clinical *Streptococcus pyogenes* strains. *Infect. Immun.* **57**, 3715–3719 (1989)
97. Yutsudo T., Murai H., Gonzalez J., Takao T., Shimonishi Y., Takeda Y., Igarashi H., Hinuma Y.: A new type of mitogenic factor produced by *Streptococcus pyogenes*. *FEBS Lett.* **308**, 30–34 (1992)
98. Yutsudo T., Okumura K., Iwasaki M., Hara A., Kamitani S., Minamide W., Igarashi H., Hinuma Y.: The gene encoding a new mitogenic factor in a *Streptococcus pyogenes* strain is distributed only in group A streptococci. *Infect. Immun.* **62**, 4000–4004 (1994)